

Validierung der JAK2 V617F Variante unter Verwendung des neuen Absolute Q™ Universal DNA dPCR Mastermixes mit dem Cycling-Programm 96°C 10'; 40x (5" 96°C / 15" 60°C) auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR-System von Thermo Fisher Scientific

Céline, Cicoria, BMA 23-26

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Kantonsspital Aarau (KSA), Molekulargenetik

1. Zusammenfassung

Die JAK2 V617F Variante (Mutation) gehört zu den BCR::ABL1 negativen Myeloproliferativen Neoplasien (MPN). JAK2 V617F ist eine rekurrente somatische Punktmutation im Exon 14, die eine permanente Proliferation der Zelle ohne Stimulation durch einen Wachstumsfaktor bewirkt. [1]

Ziel war die Validierung der JAK2 V617F Variante mithilfe einer neuen digitalen Polymerase-Kettenreaktion (dPCR)-Methode (vgl. Tabelle 1) auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR-System (dPCR-Gerät). Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Analyse erfolgte mittels Mikrofluidik-Array-Platten (MAP)-Technologie und TaqMan™-Sonden. Die resultierende Mutations-Allel-Frequenz (MAF) in Prozent wurde mit der alten Methode (vgl. Tabelle 1) verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Limit of Detection (LOD) von 0,2 %, ein Limit of Quantification (LOQ) von 1 % und eine Spezifität von 99 % erreicht wurden. Die neue Methode erfüllt die Anforderungen der medizinischen Diagnostik und wurde daher erfolgreich in die Routinediagnostik in der Molekulargenetik am KSA integriert.

Tabelle 1 Übersicht neue und alte Methode, ' = Min., " = Sek. – eigene Darstellung

neue Methode	MAF (%) der JAK2 V617F Variante auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR-System unter Verwendung des neuen Absolute Q™ Universal DNA dPCR Mastermix mit dem Cycling-Programm 96°C 10'; 40x (5" 96°C / 15" 60°C).
alte Methode	MAF (%) der JAK2 V617F Variante auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ dPCR-System unter Verwendung des alten Absolute Q™ DNA dPCR Mix mit dem Cycling-Programm 96°C 10'; 45x (5" 96°C / 15" 62°C).

2. Einleitung

Seit der Evaluierung der JAK2 V617F Variante auf dem dPCR-Gerät wurde für diese Variante der alte Mastermix verwendet. In der Molekulargenetik am KSA wurden bereits mehrere Assays, die auf dem dPCR-Gerät laufen, auf den neuen Mastermix umgestellt. Nun war auch die Umstellung der JAK2 V617F Variante auf den neuen Mastermix angezeigt.

Zudem wurden alle Assays auf dem dPCR-Gerät, mit Ausnahme der JAK2 V617F Variante, mit dem Cycling-Programm 96°C 10'; 40x (5" 96°C / 15" 60°C) durchgeführt. Die Verwendung eines standardisierten Cycling-Programms würde eine gleichzeitige Durchführung unterschiedlicher Assays auf derselben MAP-Platte ermöglichen und somit eine effiziente Labororganisation fördern. Dadurch können sowohl Zeitersparnisse erzielt als auch eine optimale Auslastung des dPCR-Geräts gewährleistet werden.

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel war es, die JAK2 V617F Variante in der Molekulargenetik am KSA unter Verwendung des neuen Mastermixes mit dem Cycling-Programm 96°C 10'; 40x (5" 96°C / 15" 60°C) auf dem dPCR-Gerät zu validieren. Angestrebt wurde eine Spezifität von 99 % sowie eine LOD von 0,2 % und eine LOQ von 1 %. Die MAF-Werte der Stichprobe wurden mit den Vorwerten verglichen, die mit dem alten Mastermix und dem Cycling-Programm 96°C 10'; 45x (5" 96°C / 15" 62°C) erhoben wurden.

Fragestellung 2: Kann eine LOD von 0,2 % und eine LOQ von 1 % mit dem neuen Absolute Q™ Universal DNA dPCR Mastermix unter Verwendung des Cycling-Programms 96°C 10'; 40x (5" 96°C / 15" 60°C) erzielt werden?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Es wurden insgesamt fünf Läufe durchgeführt, in denen 35 Proben untersucht wurden. Nach vorgängiger DNA-Extraktion wurde zunächst der Mastermix angesetzt. Anschliessend wurde die DNA zum vorbereiteten Mastermix pipettiert. Für das JAK2 V617F Assay wird jeweils eine DNA-Konzentration von 60 ng/µl eingesetzt, um sicherzustellen, dass mindestens 6'000 Gesamtkopien in die Analyse eingebracht werden. Dadurch kann eine niedrige MAF von 0,05 % für die dPCR-Assays erreicht werden.

Der aus Mastermix und DNA bestehende Reaktionsmix wurde danach in die MAP-Platte pipettiert. Die Proben wurden bei der dPCR mithilfe der MAP-Technologie in eine Vielzahl einzelner Reaktionsräume partitioniert, die jeweils unabhängige Real-Time PCR (qPCR)-Reaktionen darstellen. Zur Quantifizierung und Detektion der Zielsequenzen wurden TaqMan™-Sonden eingesetzt. Die Sonden basieren auf dem Prinzip des Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Dies ermöglicht eine fluoreszenzbasierte Signalentwicklung, die eine absolute Quantifizierung der Zielsequenzen in der Probe ermöglicht (Endpoint Absolute Quantification). Ein Teil dieser Mikroreaktionen enthält die Zielsequenz (positive Reaktionen), während andere keine Zielsequenz aufweisen (negative Reaktionen). [2]

5. Ergebnisse/ Resultate

Tabelle 2 Vergleichstabelle der Resultate der alten und neuen Methode von Lauf 5 – eigene Darstellung

		Absolute Q™ Universal DNA dPCR Mastermix 96°C 10'; 40x (5" 96°C / 15" 60°C)_neue Methode				Absolute Q™ DNA dPCR Mix 96°C 10'; 45x (5" 96°C / 15" 62°C)_alte Methode			
Lauf	Probe Nr.	VIC™ (Wildtyp) Punkte	Fam™ (Mutation) Punkte	MAF % LOQ: 1 % LOD: 0,2 %	Resultat	MAF % LOQ: 1 % LOD: 0,2 %	Vorwerte	Bewertung	
5	1	7630	1394	13.13	Pos	10.05	Pos	OK	OK
	1	7920	1427	12.87	Pos	10.05	Pos	OK	OK
	21	10755	31	0.2	unklar	0.19	Neg	OK	OK
	21	10591	29	0.19	Neg	0.19	Neg	OK	OK
	22	10164	26	0.18	Neg	0.26	unklar	OK	OK
	22	10175	34	0.24	unklar	0.26	unklar	OK	OK
	23	11630	106	0.51	unklar	0.63	unklar	OK	OK
	23	11651	91	0.53	unklar	0.52	unklar	OK	OK
	24	10536	93	0.83	unklar	0.68	unklar	OK	OK
	24	9550	78	0.6	unklar	0.71	unklar	OK	OK
	25	10728	53	0.35	unklar	0.28	unklar	OK	OK
	25	10605	50	0.33	unklar	0.29	unklar	OK	OK
	26	10166	0	0	Neg	0	Neg	OK	OK
	26	9831	0	0	Neg	0	Neg	OK	OK

6. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem neuen Mastermix unter Verwendung des Cycling-Programms 96°C 10'; 40x (5" 96°C / 15" 60°C) eine LOD von 0,2 % und eine LOQ von 1 % zuverlässig erreicht wurde. Die geringen Abweichungen sind auf die unvermeidbare Messunsicherheit zurückzuführen, der jede Messung unterliegt. Gemäss den International Consensus Classification (ICC)-Guidelines von 2022 gelten Ergebnisse mit einem Mutationsanteil von < 0,2 % als negativ, zwischen 0,2 % und 1 % als unklar und > 1 % als positiv. Bei unklaren Proben ist die JAK2 V617F Variante zwar nachweisbar, liegt jedoch unterhalb der LOQ und kann daher nicht zuverlässig quantifiziert werden. Ein unklares Ergebnis führt aber nicht dazu, dass die diagnostische Beurteilung abgeschlossen ist. Vielmehr wird das Resultat im Rahmen der Stufendiagnostik der MPN weiter abgeklärt.

Referenzen

- [1] Fuchs, R., & Staib, P. (2023). *Manual Hämatologie 2023* (33. Aufl.). Nora.
- [2] Kantonsspital Aarau. (2025). *Mutationsnachweis auf dem QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR-System (dPCR), Standing Operating Procedure (SOP)*.

Tabellen

Tabelle 1 Übersicht neue und alte Methode, ' = Min., " = Sek.

Tabelle 2 Vergleichstabelle der Resultate der alten und neuen Methode von Lauf 5